

UNTERSUCHUNGEN
ZUR BIOLOGISCHEN INAKTIVIERUNG DES
ECDYSONS

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Christiane Bode
aus Berlin

Marburg/Lahn 1968

UNTERSUCHUNGEN
ZUR BIOLOGISCHEN INAKTIVIERUNG DES
ECDYSONS

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Christiane Bode
aus Berlin

Marburg/Lahn 1968



Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am: 29. 4. 1968

Tag der mündlichen Prüfung am: 18. 5. 1968

Berichterstatter: Prof. Dr. P. Karlson

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Seidel

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	4
III. Ergebnisse	14
Biologischer Teil	14
Nachweis der Inaktivierung in vivo	14
Inaktivierung im Gesamthomogenat	15
Der Fettkörper als Organ der Ecdyson-	
Inaktivierung	17
Intrazelluläre Lokalisation des Ecdyson-	
inaktivierenden Enzymsystems	17
Messung der Enzymaktivität im Verlauf der	
Entwicklung von Calliphora erythrocephala	18
Diskussion	21
Biochemischer Teil	
Gewinnung der Rohextrakte	25
Hemmung der Phenoloxydase	25
Testsysteme	26
Abänderung der Extraktionsmethode	26
Reinigung und Anreicherung des Ecdyson-	
inaktivierenden Enzymsystems	27
Ammoniumsulfatfällung	27
Bestimmung der Ecdyson-Konzentration durch	
Messung der UV-Absorption	30
Versuche mit radioaktiv markiertem Ecdyson	30
Reinigungsversuch mit Sephadex G 75	33
Charakterisierung des Enzymsystems	36
Diskussion	40
IV. Zusammenfassung	44
V. Literaturverzeichnis	46

I. EINLEITUNG

Eines der wichtigsten Systeme zur Regulation der Entwicklung und des Stoffwechsels ist das Hormonsystem.

Hormone werden in den innersekretorischen Drüsen gebildet und durch die Körperflüssigkeit zu ihren Erfolgsorganen transportiert. Welche Wirkung sie dort ausüben, ist schon seit längerer Zeit Gegenstand der Forschung. Während zunächst nur die Säugetierhormone untersucht wurden, hat man in jüngster Zeit auch in anderen Tierklassen Hormone nachgewiesen; bei den Insekten wurden sie besonders eingehend studiert. In den dreißiger Jahren wurde die Auslösung und Regulierung der Insektenmetamorphose durch Hormone entdeckt. (FRAENKEL, 1934/35; WIGGLESWORTH, 1936) Ein Häutungshormon der Insekten wurde von KÜHN und PIEPHO (1936 + 1938) KOPEC (1922), WIGGLESWORTH (1934/36) und FRAENKEL (1934/35) nachgewiesen, aber erst FUKUDA (1940/44) hat eine klare Unterscheidung zwischen den Inkreten des Gehirns und der Prothoraxdrüse getroffen. Danach aktivieren Inkrete des Gehirns die Prothoraxdrüse und bewirken Produktion und Ausschüttung des eigentlichen Häutungshormons, des Ecdysons.

Die Wirkung des Ecdysons besteht in der Auslösung der Larvenhäutung sowie der Puppenhäutung und schließlich der Imaginalhäutung. Während dieser Häutungsperioden finden mehr oder minder starke morphogenetische Veränderungen statt; diese Veränderungen, die bei den einzelnen Häutungsschritten offenbar werden, werden durch ein zweites Insektenhormon, das Juvenilhormon gesteuert. Das Zusammenwirken dieser drei Hormone ist aus dem nachfolgenden Schema ersichtlich. (Abb. 1)

Neben der häutungsphysiologischen Wirkung beschleunigt Ecdyson auch die Regeneration (MONOD und POULSON, 1937; O'FARELL und STOCK, 1953; BODENSTEIN, 1953) und steuert den Farbwechsel, der bei einigen Lepidopteren im Zusammenhang mit der Verpuppung auftritt (BÜCKMANN, 1957).

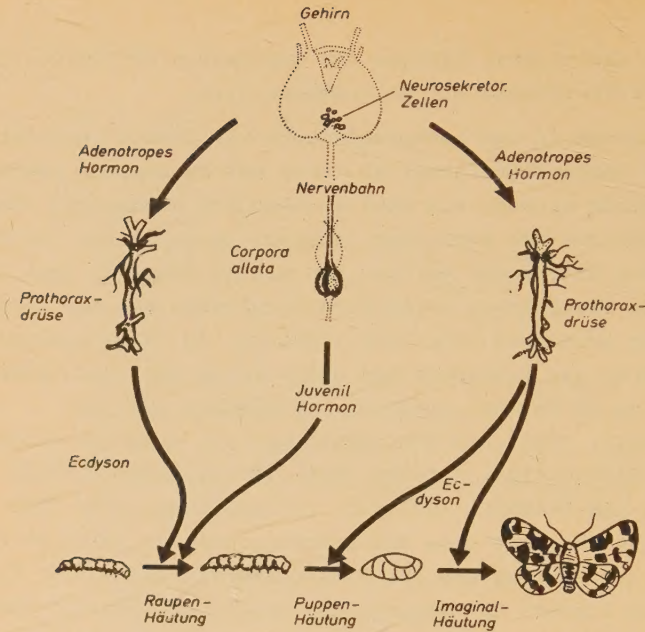


Abb. 1: Wirkung der Insektenhormone
(Aus P. Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie,
5. Aufl. 1966)

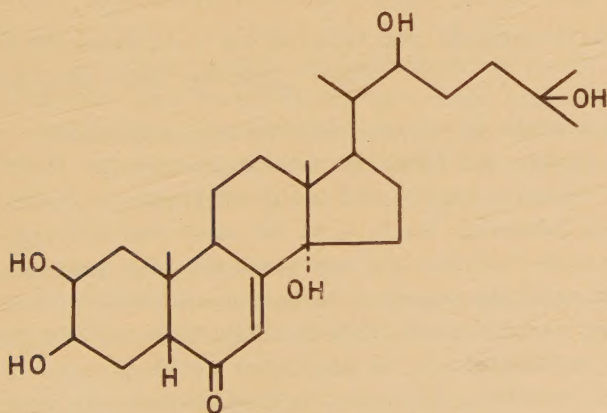
Die intrazelluläre Wirkung des Ecdysons und zahlreicher anderer Hormone besteht darin, "daß sie bestimmte Gene aktivieren und damit genabhängige Prozesse in Gang setzen" (Karlson, 1966). Die Wirkung des Ecdysons ist nicht artspezifisch. In vielen Arthropodenklassen konnte das Vorkommen von Ecdyson oder seiner Derivate wie β -Ecdyson (HOCKS, SCHULZ und KARLSON, 1967) sowie seine häutungsphysiologische Wirkung nachgewiesen werden. (KARLSON, 1957)

Die Entwicklung der Insekten verläuft über verschiedene Häutungsschritte, dementsprechend erfolgt auch die Ausschüttung des Häutungshormons nicht kontinuierlich, sondern zyklisch, wie von KARLSON und SHAYYA (1964) gezeigt werden konnte.

Der Ecdysontiter liegt während der Larvalentwicklung niedrig und steigt erst wenige Stunden vor der Pupariumbildung an; vermutlich wird durch diese Ecdysonausschüttung die Pupariumbildung und die eigentliche Puppenhäutung induziert. Bei 2 bis 5 Tage alten Puppen wurde von den Autoren ein zweites Ecdysonmaximum beschrieben. Diese Ecdysonausschüttung determiniert wahrscheinlich die Ausbildung des Imaginalgewebes.

Bestimmend für die Höhe des Hormonspiegels sind zwei verschiedene Größen. Die Produktion durch die Drüse und die Rate der Inaktivierung in den peripheren Organen. Bisher lagen keinerlei Untersuchungen darüber vor, wann, wo und in welcher Weise das zirkulierende Ecdyson inaktiviert wird.

Da Ecdyson ein Steroidhormon von der folgenden Konstitution ist, lag es nahe, einen Vergleich zur Inaktivierung der lange



(KARLSON et al., 1965; HUBER und HOPPE, 1965)

bekannten Steroide der Säugetiere zu ziehen. Diese werden in der Leber inaktiviert und anschließend im Harn ausgeschieden. Wie von HOFFMEISTER (1965) gezeigt werden konnte findet sich auch im Kot von Calliphora Larven geringe Hormonaktivität.

Es kann sich hierbei sowohl um Ecdyson handeln, wie es bei *Schistocerca* nachgewiesen wurde, als auch um Inaktivierungsprodukte dieses Hormons.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die biologische Inaktivierung des Ecdysons zu untersuchen.

Wie unten ausführlicher gezeigt wird, wurde diese Inaktivierung sowohl in vivo als auch in vitro untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Inaktivierung durch ein Enzymsystem erfolgt; es gelang ferner, das inaktivierende Enzymsystem erheblich anzureichern und seine Eigenschaften näher zu untersuchen. Außerdem wurde die Enzymaktivität im Verlauf der Entwicklung von *Calliphora erythrocephala* gemessen.

II. MATERIAL und METHODEN

Tiermaterial: Aufzucht und Haltung von *Calliphora erythrocephala* Meig (Diptera, Calliphoridae)

Die Tiere stammen aus einer institutseigenen Zucht. Die Maden werden bei normaler Raumtemperatur (20 - 24°C) und relativer Feuchte von 50 - 70 % auf möglichst magerem Freibankfleisch gehalten. Am 7. - 8. Tag nach der Eiablage verpuppen sich die Larven. Bis zum Schlüpfen der Imagines werden die Puppen zwischen Sägemehl in Gläsern aufbewahrt, die mit feiner Gaze verschlossen sind. Zur Eiablage für die Fliegen dient ein Stück Fleisch. Um möglichst zeitlich definierte Zuchten zu erhalten, wird das Eiablagefleisch nur zwei Stunden im Käfig gelassen.

Injektionsgeräte.

Für die Injektionen diente eine Mikroinjektionsspritze (Desaga, Heidelberg) mit einer 20-er Injektionsnadel. Zum Halten diente ein einfacher Mikromanipulator, der in der Institutswerkstatt hergestellt wurde.

Biologischer Test.

Es wurden Larven in dem Stadium, in dem etwa 20 % der Tiere verpuppt sind, ausgelesen und bei ihnen das vordere Körperdrittel abgeschnürt. Nach 24 Stunden ist bei etwa 30 - 40 % der abgeschnürten Tiere im Vorderteil die Pupariumbildung abgelaufen. Als Kriterium werden Braunfärbung und Sklerotisierung der Cuticula benutzt.

Die Tiere, die im Vorderteil ein Puparium gebildet haben wurden ausgelesen und nach 24 Stunden auf ungeeignete Tiere nachkontrolliert; dann wurde hinter der ersten Ligatur eine zweite Ligatur angelegt. Zur Injektion der zu untersuchenden Lösung wurde die Injektionsnadel zwischen erster und zweiter Ligatur eingeführt und mit der Mikroinjektionsspritze 10 μ l in den Hinterleib der Tiere injiziert. Für jeden Test wurden 20 - 25 Tiere verwendet. Die Auswertung der Tests erfolgte 24 Stunden nach Injektion. Je nach Grad der Hinterleibsklerotisierung, als Maß hierfür diente die Ausbreitung der Pigmentierung, wurden die Tiere mit 1,0; 0,75; 0,50 und 0,25 bewertet. Die Summe dieser Verpuppungswerte wurde als Prozent der Gesamtzahl der überlebenden Testtiere ausgedrückt. Bei einer Verpuppungsrate von 50 % erhielt der pro Tier injizierte Extrakt die Ecdysonaktivität von einer Calliphora-Einheit. (BECKER und PLAGGE, 1939; KARLSON, 1956)

Injektion von Ecdyson in vivo.

Zur Inaktivierung des Ecdyson in vivo wurde eine definierte Ecdysonlösung in die Tiere injiziert.

Injektion in geschnürte Calliphora Larven.

Die Injektion von Ecdyson in geschnürte Calliphora-Larven erfolgte nach dem für den biologischen Test angegebenen Arbeitsgang.

Injektion in ungeschnürte Calliphora Larven.

Injiziert wurde in das vordere Drittel der Tiere. Die Nadel wurde dazu durch die Intersegmentalhaut nahe der Mundöffnung eingestochen und an der Epidermis entlang nach hinten durchge-

führt. Die Injektion ließ sich am besten bei betäubten Tieren durchführen.

Bei Verwendung von Kohlendioxyd mußte dieses zur vollständigen Betäubung von Calliphora Larven 10 - 20 Minuten einwirken (NOVAK, 1959). Eine Betäubung war nötig, da sich unbetäubte Tiere stark kontrahieren und hierdurch sehr viel Hämolymphe und damit auch Ecdysonaktivität durch die Einstichstelle verloren ging. Ein Verschluß der Wunde z.B. durch Wachs war methodisch nicht durchführbar.

Während der Incubationszeit wurden die Tiere auf Filterpapier gehalten und dieses mit Methanol extrahiert, um eine Kontrolle über die ausgeflossene, bzw. ausgeschiedene Menge Ecdyson zu erhalten.

Fettkörperpräparation

Die Fettkörperpräparation wurde unter Eiskühlung in 0,2 m Phosphatpuffer plus 0,25 m Saccharose bei pH 7 durchgeführt. Nach Abtrennung des Kopfes wurde gewartet, bis ein großer Teil der Hämolymphe ausgelaufen war. Dann wurde der Fettkörper aus der Cuticula-Hülle ausgedrückt, in Pufferlösung überführt und von Darm und anderen Organen getrennt. Durch mehrmaliges Waschen mit Puffer wurden die Fettkörper noch weiter von Hämolymphe befreit und schließlich in eisgekühltem Puffer gesammelt.

Herstellung von Zellfraktionen

Die verschiedenen Zellbestandteile wurden durch fraktionierte Ultrazentrifugation voneinander getrennt. Hierzu wurden Calliphora Larven in dem unter "Fettkörperpräparation" angegebenen Phosphatpuffer mit einem Stahlhomogenisator nach Potter und Elvehjem schonend homogenisiert. Das Homogenat wurde in einer Christ-Zentrifuge bei 150 U/min drei Minuten zentrifugiert. Der gewonnene Niederschlag besteht aus Zelldebris. Der Überstand wurde nach dem von MAURER (1964) angegebenen Schema weiter fraktioniert.

Herstellung des Rohextraktes.

Vor der Aufarbeitung wurden die Tiere mit warmem destilliertem Wasser mehrmals gewaschen, dann mit 70 %igem Äthanol und zuletzt nochmals mit Aqua dest. abgespült, um die Verunreinigung durch Bakterien möglichst klein zu halten.

Zum Homogenisieren von Calliphora-Larven und -Puppen wurden zwei Geräte erprobt:

1. ein Ultra-Turrax der Firma Janke & Kunkel (Staufen) mit 200 000 U/min,
2. ein V2A-Stahl-Homogenisator nach Potter und Elvehjem mit einem Trovidurstempel, der eng eingefaßt war⁺⁾ .

Da das Homogenisieren mit dem Ultra Turrax die Enzymaktivität kaum beeinträchtigt und technisch einfacher ist, zogen wir dieses Verfahren vor.

Die Homogenate wurden zunächst kurzfristig bei 2500 U/min zentrifugiert und dabei von den größeren Zelltrümmern befreit, danach in der Spinco-Zentrifuge (Firma Beckmann) im 30er Rotor 60 Minuten bei 70 000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Druck über eine Kieselgursäule gegeben (3 cm hoch, 2 cm im Durchmesser) und dadurch von Lipiden befreit. Zum Beschicken der Säule wurde gereinigtes und geglühtes Kieselgur in Phosphatpuffer (0,2 m, pH 7) suspendiert.

Reinigung des Enzyms.

Ammoniumsulfatfällung

Die Ammoniumsulfatfällungen wurden, um eine pH-Verschiebung zu vermeiden, mit gesättigter Ammonsulfatlösung durchgeführt, die mit Ammoniak auf pH 7 eingestellt wurde. Die gesättigte Ammoniumsulfatlösung wurde dem Homogenat unter Rühren tropfenweise zugegeben. Jede Fällung wurde noch eine halbe Stunde nach Zugabe des Ammoniumsulfats weitergerührt. Danach wurde der Niederschlag 15 Minuten bei 10 000 xg abzentrifugiert. Nach

⁺⁾ Das Homogenisatorgefäß wurde in der institutseigenen Werkstatt hergestellt.

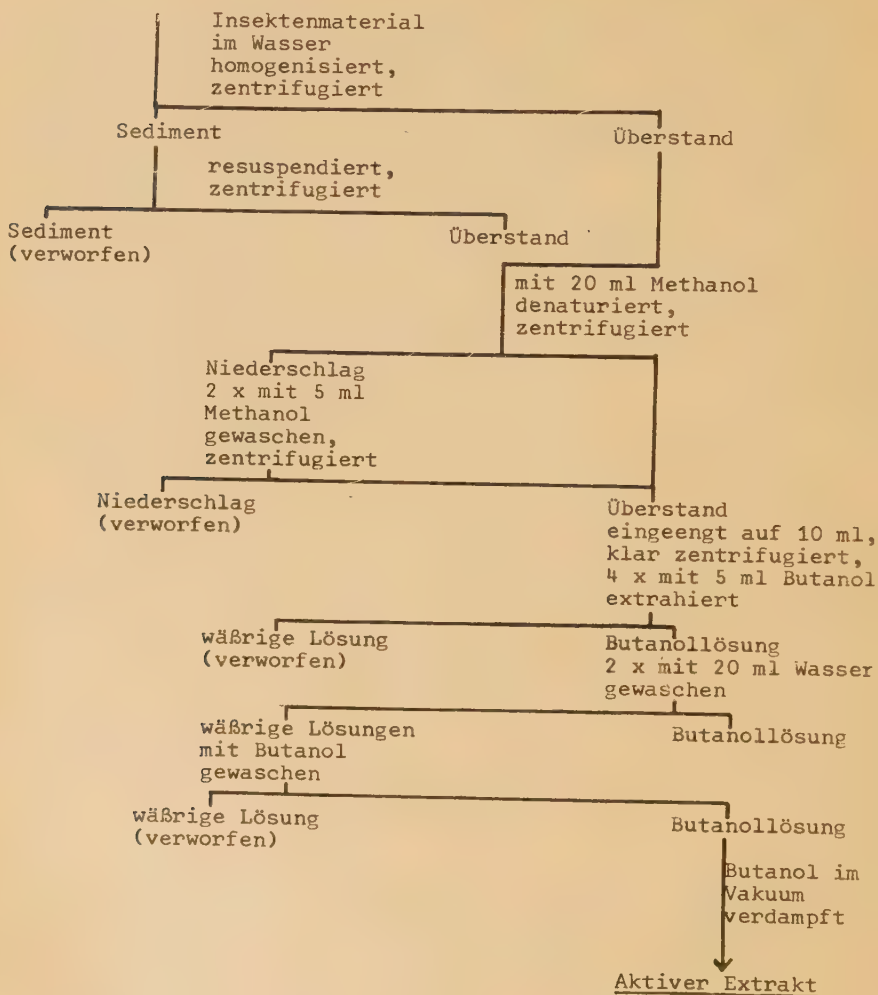
jeder Fällung wurde der Überstand wieder auf sein Ausgangsvolumen aufgefüllt. (Beisenherz et al., 1953)

Sephadex-Gefiltration.

Eine weitere Einengung der Proteinfraktion wurde mit Sephadex G 75 versucht. Es wurden 3 g Sephadex - G 75 in 100 ml Phosphatpuffer eingerührt und das Gel 24 Stunden quellen gelassen. Säulen von 15 mm Durchmesser und einer Länge von 50 cm wurden mit ca. 50 ml Gel gefüllt. Die gefüllte Säule wurde mit etwa 100 ml Puffer gewaschen und dann 3 ml der aktiven Proteinlösung bei geschlossenem Auslauf aufgetragen. Der Auslauf wurde solange geöffnet, bis die Probe eingedrungen war. Schließlich wurden 60ml Phosphatpuffer als Elutionsmittel eingefüllt und dann Fraktionen von 3 ml aufgefangen.

In den Proben wurde die Proteinkonzentration und die Ecdysoninaktivierung gemessen. ("Sephadex in Theorie und Praxis", 1967)

Abb. 3: Schema der Ecdyson-Extraktion mit Wasser
(nach P. Karlson und E. Shaaya)



Testsysteme

Incubationsbedingungen.

Die Homogenate bzw. Proteinfractionen wurden in 0,2 m Phosphatpuffer pH 7 gelöst und im Schüttelthermostaten bei 38°C zwei Stunden mit definierten Mengen Ecdyson incubiert.

Extraktion des Ecdysons.

Um eine quantitative Bestimmung des Ecdysons nach der Incubation mit dem Enzym durchführen zu können, mußte das Ecdyson aus dem Homogenat extrahiert werden.

Dazu wurde eine von Karlson und Shaaya (1964) erarbeitete und von uns abgeänderte Methode (Abb. 3) benutzt. Die Proteine wurden mit 20 ml Methanol denaturiert, der Niederschlag abzentrifugiert, das Sediment zweimal mit 10 ml Methanol gewaschen und zentrifugiert. Die Überstände wurden gereinigt, im Rotationsverdampfer bei niedriger Temperatur auf 5 ml eingengt, dann mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt und nochmals zentrifugiert. Der klare Überstand wurde viermal mit je 5 ml wassergesättigtem Butanol extrahiert. Die Butanollösungen wurden vereinigt, zweimal mit je 20 ml Wasser gewaschen und die Waschwasser wurden mit 5 ml Butanol nachextrahiert. Die Butanolphasen wurden zusammen im Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und in kleine Erlenmeyer-Kölbchen überführt. Die Methanollösung wurde an der Luft oder am Rotationsverdampfer eingetrocknet.

Säulenchromatographie.

Versuchsweise wurden zur weiteren Reinigung Aluminiumoxydsäulen nach Stahl Stufe V (30 cm hoch, 1 cm Durchmesser), mit dem Methanolextrakt beschickt. Eluiert wurde mit 500 ml eines Gemisches von Methanol-Butanol-Wasser (3:3:1). Dieses Verfahren bewährte sich jedoch nicht, da relativ viel Ecdyson verloren ging.

Bestimmung der Ecdysonkonzentration durch Messung des Ultra-Violett-Spektrums.

Zur Messung des Ultra-Violett-Spektrums des Ecdysons und seiner Inaktivierungsprodukte wurde das zur Incubation verwendete Homogenat in 3 Teile geteilt:

1. Der erste Teil wurde mit Ecdysonlösung versetzt und sofort denaturiert. Er diente als Bezugswert für die ursprüngliche Ecdysonkonzentration.
2. Der zweite Teil wurde ohne Ecdyson inkubiert und als Vergleichslösung für die Messung des Spektrums verwendet.
3. Der dritte Teil war die eigentliche Testlösung. Sie wurde mit Ecdyson versetzt und erst nach der Incubation denaturiert.

Die drei Proben wurden nach der zuvor beschriebenen Wasser-Butanol-Extraktion behandelt. Die Extrakte wurden zur Messung in 2 ml Methanol pH 7 gelöst und im Ausschwingrotor der Spinco-Ultrazentrifuge bei 20 000 xg zentrifugiert. Die Extinktion der Proben wurde im UV-Bereich im Vergleichsphotometer DK2 der Firma Beckmann gemessen.

Dünnschichtchromatographie.

Zur Dünnschicht-Chromatographie wurden mit Kieselgel HF 254 beschichtete Platten verwendet (Schichtdicke 0,2 mm).

(STAHL, 1962; HOFFMEISTER, 1963) Die Platten wurden in einem System von Benzol:Aceton:Methanol (2:2:1) 25 Minuten entwickelt. Hierbei zeigt Ecdyson einen R_f -Wert von 0,55. Da in diesem System das Inaktivierungsprodukt vom Ecdyson nicht gut getrennt wird, wurden die Platten mehrmals in verschiedenen Systemen entwickelt. Hierzu dienten folgende Systeme:

1. Chloroform : Methanol (95 : 5)
2. Chloroform : Methanol (90 : 10)

Es wurde zuerst dreimal in System 1. und dann dreimal in System 2. entwickelt.

Versuche zur Charakterisierung des Enzymsystems pH-Optimum.

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde die Proteinfraction bei unterschiedlichem pH mit Ecdyson 2 Stunden incubiert. Die Einstellung des gewünschten pH-Wertes erfolgte durch Mischung von KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 0,2 m. Die Feineinstellung der gelösten Proteinfraction wurde mit einem Knick pH-Meter durch Zugabe von Phosphorsäure oder Natronlauge durchgeführt.

Dialyse

Zur Dialyse der aktiven Proteinfraction wurde von dieser 10 ml in einen 15 mm breiten Dialyseschlauch eingefüllt und 24 Stunden in 0,05 m Phosphatpuffer bei ständigem Rühren der Außenflüssigkeit mit einem Magnetrührer bei 0°C dialysiert. Das Dialysewasser wurde nach 12 Stunden gewechselt.

Versuche zur Bestimmung der Michaeliskonstante

Zur Bestimmung der Michaeliskonstante und des Substratoptimums wurde in Parallelansätzen die aktive Proteinfraction mit Ecdysonkonzentrationen von 10 bis 200 μg bei sonst gleichen Bedingungen inkubiert.

Proteinbestimmung

Die Bildung eines Tartratkomplexes von Proteinen mit dem Biuretreagenz und seine photometrische Bestimmung ist eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der Proteinmenge in der Lösung (Weichselbaum, 1946).

Herstellung des Biuretreagenz

8 g Kalium-Natrium-Tartrat wurden in 400 ml 0,2 n carbonatfreier Natronlauge gelöst. Dieser Lösung wurde 3,0 g CuSO_4 und nach dessen vollständiger Lösung 5 g KJ zugesetzt. Die Lösung wurde mit 0,2 n NaOH auf 1 000 ml aufgefüllt.

Methode (Modifiziert nach WEICHSELBAUM)

0,3 ml einer Proteinlösung die zwischen 2 - 6 mg Protein enthielt, wurde mit Wasser auf 1 ml verdünnt. Dazu wurde unter Rühren 0,3 ml einer 3 m Trichloressigsäurelösung zugefügt.

(Robinson, 1940). Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und vom Überstand getrennt. Die gefällten Proteine wurden dann in 5 ml Biuretreagenz gelöst und mit Wasser auf ein Volumen von 10 ml verdünnt.

Die Lösung wurde bei Zimmertemperatur stehen gelassen und nach 30 Minuten die Extinktion gemessen. Von dem Wert wurde ein konstanter Blindwert abgezogen. Der Zuwachs der Extinktion bei 546 μ und einer Schichtdicke von 2 cm, multipliziert mit einem Faktor von 17,5 ist die Proteinmenge der Probe in mg. Ist die Bestimmungslösung trübe, so wurde sie mit einer Spatelspitze KCN geklärt (BODE, 1968). Der Blindwert wurde entsprechend behandelt. Als Extinktion wurde die Differenz von Farbe gegen Trübung genommen. Übersteigt die Salzkonzentration der Proteinlösung vor Zugabe von Trichloressigsäure eine Molarität von 0,3 m, so muß die Lösung verdünnt oder der Eiweißniederschlag mit 0,5 m Trichloressigsäure gewaschen werden (BEISENHERZ et al., 1952).

III. ERGEBNISSE

Biologischer Teil

1. Nachweis der Inaktivierung in vivo.

Zum Nachweis der Inaktivierung sollte Ecdyson in *Calliphora* Larven injiziert und die Abnahme der Hormonaktivität über die Zeit verfolgt werden. Da bei intakten Larven mit einer Eigenproduktion an Ecdyson zu rechnen ist, wurden zu einer ersten Versuchsreihe geschnürte Tiere verwendet, in Anlehnung an den biologischen Test.

Die Tiere wurden nach der Injektion mit 2 - 5 μ g Ecdyson pro Tier im Wärmeschrank bei 23°C gehalten und nach bestimmten Zeiten auf Ecdyson aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in der oberen Kurve der Abbildung 4 graphisch dargestellt.

Die biologische Inaktivierung erfolgte in diesen geschnürten Tieren sehr langsam. Erst nach 50 Stunden waren 50% des

Ecdysons abgebaut. Längere Incubationszeiten waren nicht möglich, da die geschnürten Tiere nicht länger als 50 - 55 Stunden am Leben zu halten waren.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden ebenfalls 2 - 5 μ g Ecdyson pro Tier in ungeschnürte Tiere gleichen Alters injiziert. Hierbei fanden sich viel höhere Inaktivierungsraten: Die ungeschnürten Tiere bauten bereits nach 2 Stunden 80 % des injizierten Ecdysons ab. (Abbildung 4 untere Kurve)

Die Konzentration des im Insektenorganismus vorhandenen Ecdysons wurde durch Extraktion einer gleichen Anzahl nicht mit Ecdyson behandelten Kontroll-Larven erfaßt. Bei der Berechnung der Abbaurate des injizierten Ecdysons wurde die Menge dieses endogenen Ecdysons berücksichtigt. Der Anteil an Ecdyson, der während der Inkubationszeit aus den Einstichöffnungen ausfloß, war unterschiedlich groß (maximal 10 % der injizierten Dosis) und wurde bei den in Abb. 4 angegebenen Werten ebenfalls mitberechnet.

Der auffallend große Unterschied im Ecdysonstoffwechsel zwischen geschnürten und ungeschnürten Tieren, ist möglicherweise durch die sehr verschiedenen Zirkulationsbedingungen der Hämolymphe bedingt. Bei geschnürten Larven ist die Zirkulation stark eingeschränkt, so daß das Hormon nicht zu den inaktivierenden Zentren gelangt.

Inaktivierung im Gesamthomogenat

In weiteren Versuchsreihen wurde Ecdyson, in einer den in vivo-Versuchen entsprechenden Konzentration (300 CE/10g Tier), Gesamthomogenaten von Calliphora Larven zugesetzt und im Schüttelthermostaten bei 38°C incubiert. Die Homogenate wurden nach ein bzw. zwei Stunden in gleicher Weise auf Ecdyson aufgearbeitet. Hierbei zeigte sich, daß nach 2 Stunden 50 - 60 % des incubierten Ecdysons inaktiviert sind.

% der injizierten
Aktivität

Inaktivierung des Ecdysons

— bei geschnürten Tieren 2-5 CE/Tier
--- bei ungeschnürten Tieren 2-5 CE/Tier

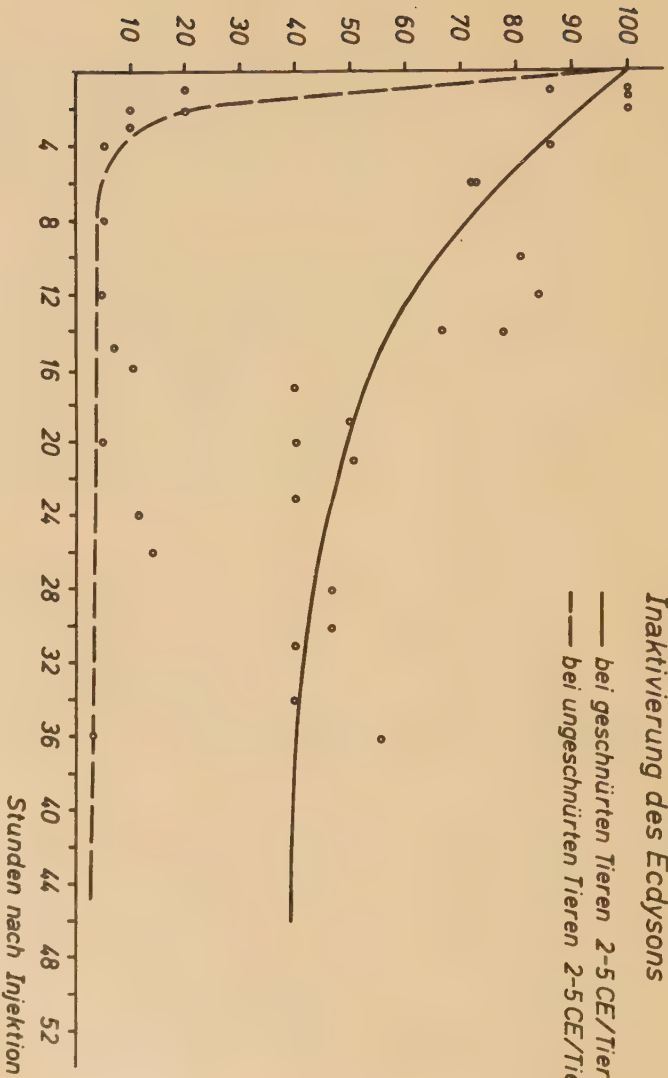


Abb. 4: Ecdysonabbau bei geschnürten (obere Kurve) und ungeschnürten (untere Kurve) *Calliphora* Larven. Abhängigkeit der Inaktivierung von der Zeit nach der Hormoninjektion.

Der Fettkörper als Organ der Ecdyson-Inaktivierung

Für die Säugetiersteroide ist die Leber das Inaktivierungs- und Ausscheidungsorgan, und da es viele Hinweise dafür gibt, daß der Fettkörper der Insekten in seinen Aufgaben der Leber entspricht, war es naheliegend, die Inaktivierung des Ecdysons im isolierten Fettkörper zu untersuchen.

Hierzu wurde die Ecdysonaktivierung im isolierten Fettkörperhomogenat, im Homogenat des übrigen Körpers und im Gesamthomogenat bestimmt. Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, ist die Aktivität des Ecdysonabbaues in den Fettkörpern mehr als dreimal so groß wie im übrigen Körper.

Homogenat	Ecdysonkonzentration in Calliphora-Einheiten	% Inaktivierung
Ecdysonkontrolle	7 000 $\pm$ 800	-
Gesamthomogenat	3 500 $\pm$ 500	50 $\pm$ 14 %
Fettkörper	3 700 $\pm$ 250	53 $\pm$ 7 %
Gesamttier- Fettkörper	6 000 $\pm$ 350	15 $\pm$ 6 %

Tabelle 1: Lokalisation der Ecdyson abbauenden Aktivität
(Mittelwerte aus drei Einzelmessungen)

Intrazelluläre Lokalisation des Ecdyson-inaktivierenden Enzymsystems.

Zur Klärung der Frage, wo das inaktivierende Enzymsystem innerhalb der Zelle lokalisiert ist, wurden die Zellbestandteile aus dem Gesamthomogenat von Calliphora Larven durch fraktionierte Zentrifugation getrennt und jeweils gesondert mit 75 μ g Ecdyson incubiert. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse in % Inaktivierung der eingesetzten Ecdysonmenge wiedergegeben. Die stärkste Inaktivierung findet sich im Überstand (lösliche Enzymfraktion), in der Fraktion zwischen 6 600 und 100 000 xg (Mikrosomenfraktion) fand sich eine geringe Aktivität, während sich in den übrigen Fraktionen keine Aktivität nachweisen ließ. Die geringe Aktivität in den Mikrosomen ist

eventuell auf Verunreinigung durch den Überstand zurückzuführen.

Fraktionen	Zentrifugation (xg)	Ecdysonkonzentration in CE.	% Inaktivierung
Zelldebris	150	7 000 $\pm$ 800	-
Zellkerne	600	7 000 $\pm$ 700	-
Mitochondrien	6 600	7 200 $\pm$ 550	-
Mikrosomen	100 000	6 000 $\pm$ 300	14 %
Zellsaft	Überstand	2 600 $\pm$ 500	63 %
Ecdyson-Kontrolle	-	7 000 $\pm$ 800	-

Tabelle 2: Inaktivierung des Ecdysons in den durch fraktionierte Zentrifugation gewonnenen Zellbestandteilen. (% Inaktivierung wurden in Bezug zur Ecdysonkontrolle angegeben. Mittelwerte aus vier Versuchsreihen.)

Messung der Enzymaktivität im Verlauf der Entwicklung von *Calliphora erythrocephala*

Wie in der Einleitung ausgeführt, steuert das Ecdyson die zyklisch ablaufenden Häutungsprozesse. Dementsprechend findet man sehr starke Schwankungen des Ecdysontiters, die auf unterschiedliche Sekretionsraten des Hormons zurückgeführt wurden (SHAAYA und KARLSON, 1966). Wie die obere Kurve der Abbildung 5 zeigt, ist der Ecdysonspiegel bis zum 7. Tage des Larvenstadiums niedrig und steigt erst wenige Stunden vor der Pupariumbildung rasch an. Die Umwandlung zur Puppe ist bei *Calliphora* nicht von einer Häutung begleitet (TATE, 1953), sondern die weiche helle Larvencuticula wird durch einen Prozeß, der als "Sklerotisierung" bezeichnet wird, in die harte braune Cuticula umgewandelt. Die diesem Prozeß zugrundeliegende biochemische Reaktion ist die Umwandlung von Tyrosin zu Chinonen mit anschließender Chinongerbung der Cuticula-Proteine. Voraussetzung für die Chinonbildung ist die Umschaltung des Tyrosinabbaus von p-Hydroxyphenylpropionsäure auf N-Acetyl-Dopamin als Endprodukt. Schlüssel-

enzym hierfür ist die Dopa-Decarboxylase, deren Aktivität gleichzeitig mit dem Ecdysontiter ansteigt. Der Aktivitätsanstieg ist durch Induktion der Neusynthese dieses Enzyms durch Ecdyson bedingt. (SEKERIS et al. 1966) Unmittelbar nach Abschluß der Pupariumbildung kommt es zu einem raschen Abfall des Ecdysongehaltes, gefolgt von einem flacheren Ecdysonmaximum am 12. - 13. Tag der Entwicklung. Der zweite Gipfel wird mit der Differenzierung des Imaginalgewebes in Zusammenhang gebracht.

Bei Kenntnis dieser Zusammenhänge war es interessant, die Aktivität des Ecdyson-inaktivierenden Enzymsystems während der Entwicklung von *Calliphora* zu prüfen. Mit der Messung der Enzymaktivität im Homogenat stand eine verhältnismäßig zuverlässige Methode zur Verfügung, um den Ecdyson-Abbau im Tier zu messen. Hierzu wurden *Calliphora* Larven und Puppen verschiedenen Alters homogenisiert und mit 70^{µg} Ecdyson incubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 wiedergegeben.

Es war überraschend, daß die Aktivität des inaktivierenden Enzymsystems außerordentlich starken Schwankungen unterworfen ist: Abb. 5.

Bis zum 7. Tag des Larvenstadiums ist die Ecdyson abbauende Aktivität relativ hoch. Wenige Stunden vor der Pupariumbildung zur Zeit des ersten Ecdyson-Maximums findet sich kaum noch Aktivität. Kurz nach der Pupariumbildung steigt sie wieder an (80 % Inaktivierung bei 2 - 3 Stunden alten Puppen) und fällt danach nochmals ab. Inaktivierungsversuche an sieben Tage alten Puppen zeigen schließlich wieder einen Ecdysonabbau von 50 %.

Im Ganzen ergibt sich damit ein Verlauf, der sich genau gegensinnig wie der Ecdysontiter verhält.

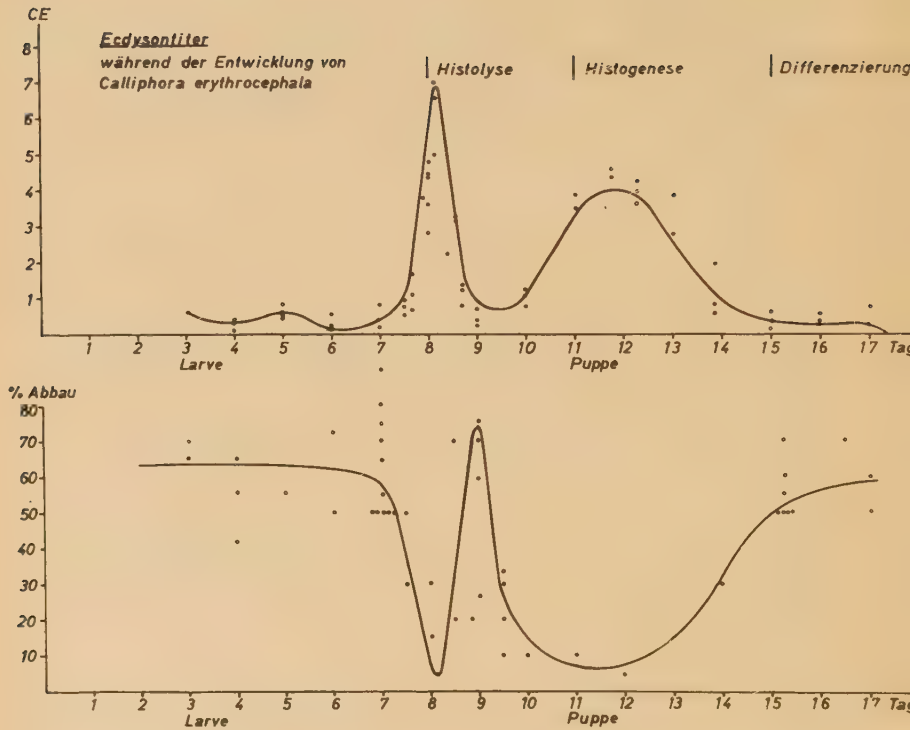


Abb. 5: Ecdysontiter (obere Kurve) und Aktivität des abbauenden Enzymsystems (untere Kurve) während der Entwicklung von *Calliphora erythrocephala*. Angabe des Ecdysongehalts in *Calliphora*-Einheiten (CE) pro Abbau = Inaktivierung in % des eingesetzten Ecdysons.

Diskussion.

Die Regulation der Konzentration von Hormonen im Organismus kann grundsätzlich über folgende Wege verlaufen: Produktion, Abbau und Ausscheidung.

Für die Steroidhormone der Wirbeltiere wurden alle drei Wege nachgewiesen. Die Produktion wird durch übergeordnete Regulations-Zentren gesteuert. Als Beispiel sei hier die Glucocorticoidproduktion in der Nebennierenrinde betrachtet, die durch ACTH stimuliert wird. Die Inaktivierung der Glucocorticoide, um bei diesem Beispiel zu bleiben, erfolgt in der Leber. Die an dem Abbau beteiligten Enzyme wurden zum Teil bereits in hochgereinigter Form isoliert. Innerhalb der Zelle sind die Enzyme vorwiegend den Mikrosomen zugeordnet. Eine Ausscheidung aktiver Glucocorticoide findet normalerweise nicht statt. Die inaktivierten Produkte werden hauptsächlich als Tetrahydrocortisol, Tetrahydrocortison, β Cortol und β Cortolon im Harn ausgeschieden. (WILLIAMS, 1962) Während der Entwicklung von *Calliphora erythrocephala* wurden, wie oben erwähnt, starke Schwankungen des Ecdysonspiegels innerhalb kurzer Zeitspannen beobachtet. (SHAAYA und KARLSON, 1965) Eine nennenswerte Ausscheidung von aktivem Ecdyson bei *Calliphora* als Ursache für diese Schwankungen ist nach den Ergebnissen von Hoffmeister (1965) unwahrscheinlich; diese Befunde konnten bei eigenen Vorversuchen bestätigt werden.

Entscheidend für die Abnahme der Ecdyson-Konzentration ist ein inaktivierendes Enzymsystem, das sowohl in vivo als auch in vitro nachgewiesen wurde. Selbst bei Berücksichtigung der relativ großen Mengen an exogen zugeführtem Ecdyson erfolgt die Inaktivierung in den Testtieren rasch; dies muß in Rechnung gestellt werden, wenn bei biologischen Versuchen größere Mengen des Hormons auf einmal injiziert werden. Es ist dann mit einem erheblichen Abbau innerhalb kurzer Zeit zu rechnen. KARLSON et al. (1964) fanden einen erheblichen Teil des injizierten radioaktiv markierten Ecdysons in den Fettkörpern und vermuteten, daß hier die Inaktivierung erfolgt.

Diese Vermutung wurde durch die eigenen Ergebnisse bestätigt (Tab. 1). Das inaktivierende Enzymsystem fand sich hauptsächlich im Fettkörper, einem Organ, das der Leber der Wirbeltiere auch hinsichtlich anderer Funktionen analog ist.

Da der Fettkörper sich bei der Präparation nicht quantitativ von dem übrigen Tier trennen ließ, ist es durchaus möglich, daß auch die restliche Aktivität in den übrigen Körperteilen diesem Organ zuzuschreiben ist.

Etwas überraschend ist die ausschließliche Lokalisation des Enzymsystems im partikelfreien Überstand. In Analogie zur Lokalisation der an der Steroidhormon-Inaktivierung beteiligten Enzyme in der Leber von Wirbeltieren hatten wir erwartet, daß es sich mindestens zum Teil um ein mikrosomales Enzym handeln würde. Wir hielten uns bei der Aufarbeitung der Gewebe an die Methoden, die für Lebergewebe angegeben sind. Eine methodisch bedingte Zerstörung der Mikrosomen und Freisetzung des Enzyms ist daher nicht wahrscheinlich.

Mit der Messung der Inaktivierung im Homogenat eröffnete sich die Möglichkeit zur biochemischen Charakterisierung des Enzymsystems, die im zweiten Teil behandelt wurde.

Bemerkenswert ist die Differenz der Abbaurate zwischen geschnürten und ungeschnürten Tieren. Eine gestörte Zirkulation der Hämolymphe in den geschnürten Tieren mag ein ursächlicher Faktor sein. Da das injizierte Ecdyson innerhalb kurzer Zeit an seinen Wirkungsort - die Cuticula - gelangt, wie die einige Stunden nach der Injektion einsetzende Verpuppung zeigt (z.B. Biologischer Test) ist dieses als alleinige Erklärung jedoch unbefriedigend. Möglicherweise unterbleibt durch die Abtrennung des Kopfteiles die Produktion eines Faktors, der für die Aktivierung oder Neubildung des Ecdyson-inaktivierenden Enzymsystems erforderlich ist. Dieser Frage muß jedoch erst in weiteren Untersuchungen nachgegangen werden.

Von besonderem Interesse ist der Befund, daß die Aktivität des inaktivierenden Enzymsystems außerordentlich großen Schwankungen unterworfen ist. Hierbei ergibt sich ein Verlauf der Enzymaktivität, der sich auffällig genau gegenständig zum Ecdysontiter verhält (Abb. 5).

Es ist denkbar, daß der aktuelle Ecdysonspiegel durch unterschiedliche Aktivität des abbauenden Enzymsystems bestimmt wird. Die Maxima der Ecdyson-Konzentration sind dann durch die niedrige Aktivität des abbauenden Enzymsystems bedingt. Dabei wäre eine Steuerung der Bildung dieses Enzymsystems bzw. einer wechselnden Aktivierung und Inaktivierung desselben durch einen übergeordneten Regulationsmechanismus anzunehmen. Für diese Annahme spricht die Beobachtung, daß bei Larven, bei denen der Kopfteil abgeschnürt ist, die Aktivität des abbauenden Enzymsystems stark reduziert ist. Als mögliches Regulationszentrum sind die neurosekretorischen Zellen zu nennen.

Zur Frage, welcher Art der diskutierte Einfluß des im Kopfteil zu vermutenden Regulationszentrums auf die Bildung des inaktivierenden Enzymsystems ist, kann auf Grund der hier mitgeteilten Ergebnisse keine Aussage gemacht werden.

Außer dem regulierenden Einfluß von Faktoren, deren Produktion im Kopfteil der Larve zu vermuten ist, ist an zwei weitere Mechanismen zur Regulation der Aktivität des Ecdyson abbauenden Enzymsystems zu denken:

Es ist ein direkter Einfluß des Ecdysontiters auf die Enzymneubildung möglich. Bekannt ist das Phänomen der Enzyminduktion durch Ansteigen des Substratspiegels; so wurde zum Beispiel bei *Escherischia coli* durch Zusatz von Milchzucker zum Nährmedium die β -Galaktosidaseaktivität beträchtlich erhöht.

In diesem Fall wird nach der Hypothese von JACOB und MONOD (1961) das durch "Regulationsgene" gebildete "Repressor"-Molekül durch das Substrat (Lactose) als "Induktor" aus dem

Gleichgewicht entfernt. Die Blockierung der Synthese der "messenger" RNS am "Strukturgen" durch den "Repressor" wird damit aufgehoben und nach der Neusynthese der "messenger" RNS erfolgt der Anstieg der Enzymproduktion. Für das Ecdyson inaktivierende Enzymsystem wäre, wenn man einem solchen Mechanismus erwägt, allerdings ein genau umgekehrter Effekt des Substrates (Ecdyson) anzunehmen, wie im Fall der Lactose, das heißt, (die Bildung des "Repressors" oder) die Bindung des "Repressor"^{an} das "Strukturgen" müßte durch Ecdyson gefördert werden, ein Mechanismus, der ebenfalls von MONOD et al. diskutiert wird. Hierdurch könnte die Abnahme der Aktivität des inaktivierenden Enzymsystems in der Phase einer gestiegenen Ecdysonsynthese werden.

Ein zweiter Weg, wie es zu dem reziproken Verhalten der Enzymaktivität zu dem Ecdysontiter kommen könnte, ist eine unmittelbare Hemmung durch Substrate, die unter der Einwirkung einer höheren Ecdysonkonzentration entstehen. Eine Umschaltung des Tyrosinabbaus mit nachfolgendem Anstieg der Dopa-Decarboxylase Aktivität, dem Schlüsselenzym für das N-Acetyldopamin, durch Ecdyson wurde wie oben angeführt von SEKERIS et al. (1966) beschrieben. Es ist denkbar, daß sich die Konzentration weiterer Substrate ändert. Gegen die Annahme eines Hemmeffektes dieser Art sprechen die Incubationsversuche mit Calliphora Homogenaten. Hierbei wurde die gleiche Abnahme der Aktivität des Ecdyson inaktivierenden Enzymsystems gefunden, wie bei den in vivo Versuchen. Die eventuell in Frage kommenden Hemmfaktoren werden, wenn nicht eine feste Bindung an das Enzymprotein angenommen werden soll, durch den Aufarbeitungsgang (Verdünnung für die Homogenisierung) eliminiert, und die Hemmung der Enzymaktivität müßte bedeutend geringer sein als bei den in vivo-Versuchen.

Die oben aufgestellte Hypothese einer Regelung des aktuellen Ecdysontiters durch die Aktivität des abbauenden Enzyms ließe an eine konstante Hormonproduktion denken. Hiergegen sprechen allerdings Beobachtungen von KAISER (1949). Von ihm wurden deutlich morphologische Veränderungen der Protoraxdrüse während der Entwicklung von Insekten beschrieben. Da die

Ecdysonproduktion in den Prothoraxdrüsen stattfindet, läßt eine Größenänderung dieses Organs auf Änderung der Produktionskapazität für Ecdyson schließen, analog der Anpassung innersekretorischer Drüsen von Wirbeltieren bei wechselndem Hormonbedarf.

Biochemischer Teil

Mit dem Nachweis der Inaktivierung von Ecdyson im Homogenat von Calliphora Larven und Puppen war der Weg frei zur biochemischen Charakterisierung und wenn möglich ^{zur} Anreicherung des Enzymsystems. Im Verlauf dieser Untersuchungen war es ferner von Bedeutung, für die Gewinnung der Enzympräparate ein geeignetes Entwicklungsstadium auszuwählen. Die oben geschilderte, ungewöhnlich hohe Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Entwicklungsstadium war zu Beginn der Untersuchungen noch nicht bekannt, so daß die optimalen Bedingungen erst zu einem späteren Zeitpunkt erarbeitet werden konnten.

Gewinnung der Rohextrakte

Ausgangsmaterial für die Anreicherung des Enzymsystems waren 1 - 2 Stunden alte Calliphora-Puppen. Die Puppen wurden stündlich aus der Zucht ausgelesen und dann unmittelbar bei -20°C eingefroren. Beim Homogenisieren mit einem Ultra Turrax für eine Minute ging ein Teil der abbauenden Enzymaktivität verloren. Dieser Aktivitätsverlust war wahrscheinlich durch stärkere Erwärmung bedingt. Er konnte vermieden werden, wenn jeweils nur 5 - 10 Sekunden homogenisiert und anschließend für eine Minute im Eisbad gekühlt wurde.

Hemmung der Phenoloxydase

Homogenate von Calliphora Larven und Puppen färben sich an der Luft sehr schnell dunkel. Ursache ist die hohe Phenoloxydase-Aktivität im Verein mit den endogen vorhandenen Substraten.

In solchen Homogenaten ist nur eine geringere Inaktivierung des Ecdysons meßbar; vermutlich werden die betreffenden Enzyme von den Chinonen, die durch die Wirkung der Oxydase

entstehen, vergiftet. Hinzu kommt, daß die entstehenden Farbstoffe die Messung des UV-Spektrums (siehe unten) stören.

Es war deshalb wichtig, die Phenoloxydase auszuschalten. Phenylthioharnstoff ist zwar ein wirksamer Hemmstoff der Phenoloxydase, hemmt jedoch gleichzeitig die Inaktivierung des Ecdyson und ist somit ungeeignet. Als optimal erwies sich Ascorbinsäure in einer Konzentration von 2 % (20mg/ml). Sie hemmt die Phenoloxydase, ohne die Ecdysoninaktivierung zu beeinflussen und wurde daher für die meisten Versuchsansätze verwendet. Da reduzierte Ascorbinsäure bei 265 m μ ein Absorptionsmaximum besitzt, wurde es für Versuche, in denen das UV-Spektrum direkt im Homogenat gemessen wurde, durch Natriumdithionit ersetzt.

Testsysteme

Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms erfolgte im Gesamt-Homogenat, im klaren Homogenatüberstand oder in der gereinigten Proteinfraction. Es wurde eine Menge von 70 μ g Ecdyson zugesetzt und nach zweistündiger Incubation im Schüttelthermostaten bei 30°C der verbleibende Rest an Ecdyson nach einer von Karlson und Shaaya erarbeiteten Extraktionsmethode extrahiert. Die Aktivität der Extrakte wurde im biologischen Test bestimmt (s. Material und Methoden).

Abänderung der Extraktionsmethode

Bei den ersten Versuchen die nach dem bisher üblichen Extraktionsverfahren (KARLSON und SHAAYA, 1964) aufgearbeitet wurden, traten bei Parallel-Versuchen Abweichungen der Ergebnisse bis zu 30 % auf. Deshalb wurde versucht, durch Abänderung der Extraktionsmethode besser reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Hierzu wurde, um die kritischen Punkte der Aufarbeitung zu finden, die Extraktion unter extremen Bedingungen durchgeführt.

Die Denaturierung des Homogenats zwischen 80 und 90°C wurde auf 90 Minuten verlängert. Bei diesem Vorgehen gingen 20 %

der Ecdysonaktivität verloren. Wir ersetzten daher die Hitze-denaturierung durch eine Alkoholdenaturierung mit anschließender kurzer Erhitzung (ca. 6 Minuten). Durch zweimaliges Extrahieren des denaturierten Proteins mit je 10 ml Methanol wurde eine vollständige Extraktion des Ecdysons erreicht. Durch weitere Extraktionsschritte konnte keine Verbesserung der Ergebnisse erzielt werden.

Bei 1 1/2 stündigem Trocknen des in Butanol aufgenommenen Extraktes stellten wir ein Ecdyson-Konzentrationsverlust bis zu 30 % fest. Der Endextrakt wurde daher in Methanol aufgenommen und im Vakuum getrocknet.

Reinigung und Anreicherung des Ecdyson-inaktivierenden Enzymsystems.

Die Aufarbeitung des Calliphora-Homogenats ist in Abb. 6 schematisch dargestellt. Wie Tabelle 2 zeigt ist das inaktivierende Enzymsystem löslich. Für eine weitere Reinigung (Anreicherung) wurde deshalb das Homogenat 1 Stunde bei 70 000 xg zentrifugiert und der Überstand verwendet.

Bei Entnahme des Überstandes wurde zunächst vorsichtig die stets vorhandene Lipidschicht abgehoben. Die bei der Zentrifugation noch im Überstand verbliebenen Lipide, die die weitere Aufarbeitung stören, konnten durch Filtration durch eine Kieselgursäule ohne Verlust an Enzymaktivität weitgehend eliminiert werden.

Ammoniumsulfatfällung.

Die Ammoniumsulfatfällung ist sowohl für die Fraktionierung von Proteinen als auch für die Reinigung von Enzymen eine gängige und bewährte Methode. In entsprechenden Vorversuchen wurde ein Aufarbeitungsschema entwickelt, welches in Abbildung 6 dargestellt ist.

Um das, das Ecdyson inaktivierende Enzymsystem von unwirksamen Proteinen zu befreien, wurde der filtrierte Überstand des Calliphora Homogenats durch steigende Sättigung mit Ammoniumsulfat fraktioniert gefällt. Der Arbeitsgang ist dabei folgender (Schema Abb. 6):

1-2 Stunden alte Calliphora-Puppen

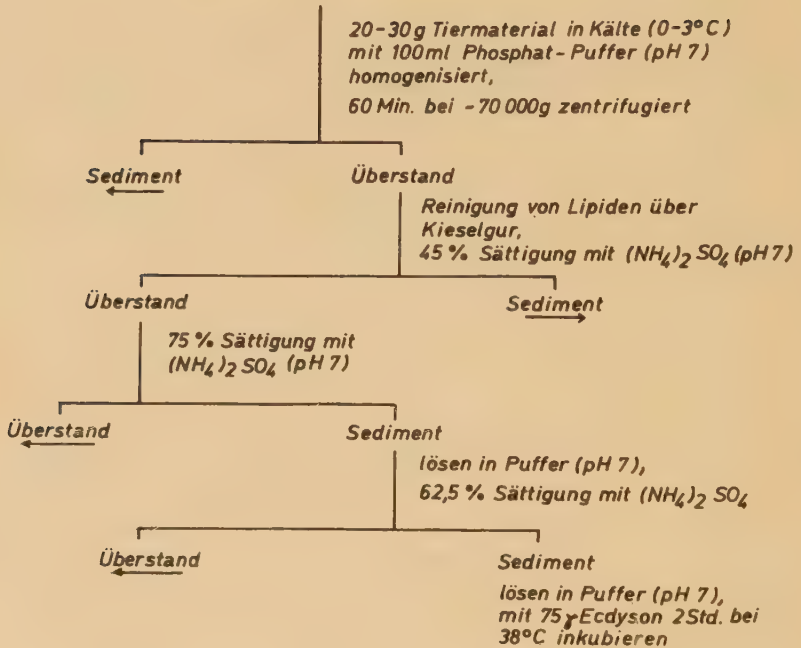


Abb. 6: Schema der Reinigung und Anreicherung des Ecdyson-inaktivierenden Enzymsystems.

Der Extrakt wurde durch langsame und kontinuierliche Zugabe von gesättigter Ammoniumsulfatlösung (3,8 m) bei pH 7 zunächst auf 45 % Sättigung gebracht. Das hierbei erhaltene Sediment enthielt nur zu vernachlässigende Mengen Ecdyson abbauende Aktivität, während sich im Überstand das inaktivierende Enzymsystem befand. Bei weiterer Sättigung bis 75 % wurde die gesamte Enzymaktivität gefällt. Der Überstand enthielt keine Aktivität und wurde verworfen. Das Sediment wurde in 50 ml, 0,2 m Phosphatpuffer aufgenommen. Durch erneute Ammoniumsulfatsättigung bis 65,5 % konnte fast die

Ammoniumsulfatfraktion % Sättigung	Wiedergefundenes Ecdyson nach Incubation Calliphora Einheiten	% Inaktivierung	mg Protein pro Fraktion
Ecdysonkontrolle	7000 ± 1200	0 %	-
⁰ (Homogenatüberstand)	3500 ± 1000	50 %	320 mg
0 - 45	6800 ± 600	7 %	65 mg
45 - 75	2000 ± 800	70 - 75 %	95 mg
45 - 62,5	1500 ± 600	75 - 80 %	55 mg
62,5 - 75	6800 ± 1400	2 %	40 mg
75 - 100	7200 ± 800	0 %	90 mg
62,5 - 100	6900 ± 700	2 %	140 mg

Tabelle 3: Reinigung des Ecdyson-inaktivierenden Enzymsystems aus *Calliphora erythrocephala* Ammoniumsulfatfraktion: Präzipitat der angereicherten Ammoniumsulfatsättigung, s. Aufarbeitungsschema Abb. 6 Erlduterungen im Text.

gesamte Enzymaktivität ausgefällt werden. Durch diesen letzten Schritt erfolgte außer der weiteren Einengung der Enzymfraktion die Reinigung durch Umfällung. Das Präzipitat der Fraktion zwischen 45 und 62,5 % Ammoniumsulfatsättigung wurde in 15 ml Puffer aufgenommen und 3 ml pro Versuchsan-satz verwendet. Von der Gesamtproteinmenge des Homogenat-überstandes waren in dieser Fraktion nur noch 17 % vorhanden (Tab. 3). Das Ecdyson inaktivierende Enzymsystem konnte somit um einen Faktor⁶/angereichert werden. Die mit dem Calli-phora Test gefundenen Ergebnisse sind in Tabelle 3 darge-stellt.

Bestimmung der Ecdyson-Konzentration durch Messung der Absorption.

Ecdyson hat im Ultravioletten ein ausgeprägtes Absorptions-maximum bei 241 m μ . Dieses Maximum könnte durch die Konju-gation der Ketogruppe mit der Doppelbindung zustande kommen (HOFFMEISTER et al. 1965). Falls bei der biologischen Inak-tivierung des Ecdysons dieses Chromophore System verändert wird, so ist eine Abnahme der Absorption bei 241 nm zu er-warten. Um dieses zu prüfen, wurde Ecdyson mit dem angerei-cherten Enzymkomplex für zwei Stunden incubiert und nach der zuvor beschriebenen Methode extrahiert. Die Absorption die-ses Extraktes wurde bei 241 m μ gemessen und von dem Ausgangs-wert - Ecdyson plus Enzym, sofort denaturiert - abgezogen.

Die Absorptionsdifferenz gemessen als % des Ausgangswertes entspricht etwa den Ergebnissen, die im Calliphora-Test (Abb.4) erhalten wurden. Jedoch ist die Absorptionsmessung mit me-thodischen Fehlern behaftet, da der Blindwert ohne Ecdyson schon hohe Absorption zeigt. Eine direkte Messung des Homo-genats war wegen der vielen Verunreinigungen bisher nicht möglich.

Versuche mit radioaktiv markiertem Ecdyson.

Bestimmung der Ecdysoninaktivierung.

Der Calliphora Test für Ecdyson ist zwar sehr empfindlich, (Nachweisgrenze bis 0,01^{ng}/Ecdyson), hat jedoch den Nachteil der meisten biologischen Tests, daß die Meßergebnisse relativ

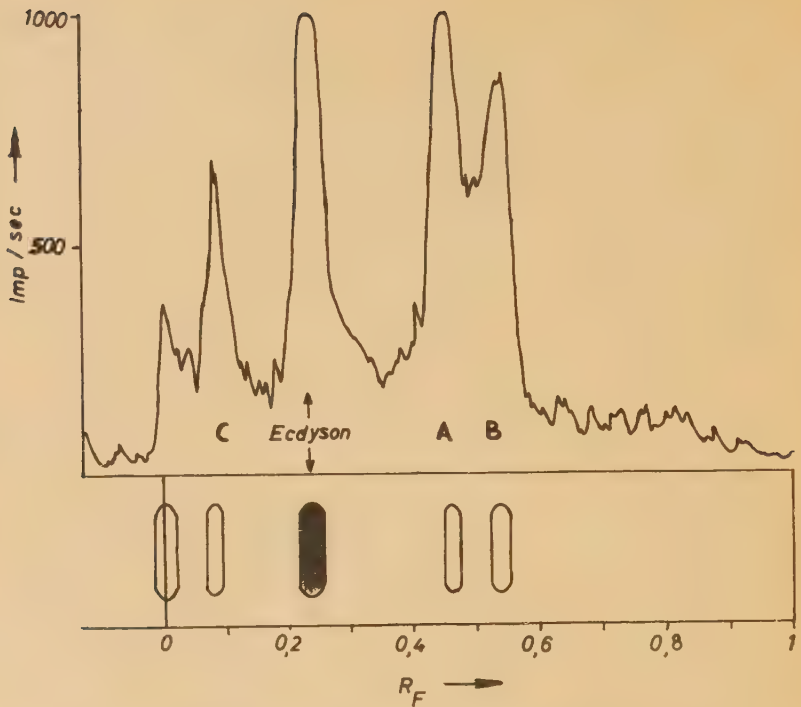
Versuch	Extinktion des Ecdysons bei 241 m μ	Calliphora Einheiten (nach biol. Test)	% Inaktivierung nach Extinktion biol. Test	
Ecdyson	0,95	4 600	0 %	0 %
Incubation I	0,62	2 900	65 %	59 %
Incubation II	0,57	2 500	60 %	54 %
Incubation III	0,56	2 300	59 %	50 %
Incubation IV	0,39	1 800	41 %	40 %

Tab. 4: Bestimmung der Ecdysoninaktivierung durch Messung der UV-Extinktion und im biologischen Test.

stark schwanken. Durch die Einführung radioaktiv markierten Ecdysons konnten sehr viel besser reproduzierbare Werte erhalten werden. Es wurde 20 μ g des an C₂₃ und C₂₄ mit Tritium markierten Ecdysons zusammen mit 50 μ g unmarkiertem Träger-Ecdyson in üblicher Weise mit dem gereinigten Enzymsystem inkubiert, anschließend auf Dünnschichtplatten in einem System von Chloroform und Methanol mehrmals entwickelt und die Aktivität im Dünnschichtscanner gemessen. Wie Abbildung 7 zeigt, nimmt der Ecdysongipfel nach Incubation mit dem inaktivierenden Enzymsystem im Vergleich zu dem Ausgangswert ab. Die Ergebnisse mit diesem System sind gut reproduzierbar. Mit diesem Verfahren können Ecdysonmengen ab 5 μ g erfaßt werden; der Gewinn an Genauigkeit im Vergleich zum biologischen Test geht somit zu Lasten der Empfindlichkeit.

Inaktivierungsprodukte.

Bei der radiodünnschichtchromatographischen Bestimmung von Ecdyson nach Inkubation mit dem inaktivierenden Enzymsystem fiel auf, daß im Chromatogramm neben dem Ecdyson noch drei weitere Aktivitätsgipfel vorhanden waren. Es handelt sich also wahrscheinlich um drei Inaktivierungsprodukte, und nicht nur um eines. Zwei dieser Produkte (A und B) sind dem chromatographischen Verhalten nach unpolarer und eines (C) polarer als Ecdyson. Die Konzentration des polaren Inaktivierungsproduktes (C) wechselt von Versuch zu Versuch sehr stark und



Radio-Dünnschichtchromatogramm des ^3H -Ecdysons und seiner Inaktivierungsprodukte.

Abbildung 7

zeigte ein umgekehrt proportionales Verhalten zur Konzentration des Inaktivierungsproduktes B. Da dieses Produkt bei Zusatz von Antibiotika (Penicillin) nicht auftrat, besteht die Vermutung, daß es sich hierbei um ein bakterielles Zerstörungsprodukt von dem Inaktivierungsprodukt B handelt.

Im Gegensatz zum Ecdyson wiesen sämtliche Inaktivierungsprodukte nur eine sehr geringe Eigenfluoreszenz im UV-Licht

bei 254 m μ auf. Eine weitere Charakterisierung der drei Produkte konnte bisher nicht vorgenommen werden.

Zur Bestimmung ihrer biologischen Aktivität wurden die Abbauprodukte im Biologischen Test geprüft. Ihre Wirkung ist aus der folgenden Tabelle zu ersehen.

Produkt	Injektion % pro Tier $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$	Verpup- pung im biol. Test	CE/ Injek- tion	Aktivität in %
Ecdyson	0,01	56 %	1,32	100 %
Abbauprodukt A	0,05	30 %	0,32	4,7 %
Abbauprodukt B	0,05	20 %	0,18	2,7 %
Abbauprodukt C	0,05	55 %	1,3	19 %

Tabelle 5: Wirkung der Inaktivierungsprodukte des Ecdysons in Prozent der Ecdyson-Aktivität. Die Konzentration der Abbauprodukte ($\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) wurde aus der gemessenen Radioaktivität bestimmt.

Durch Verwendung des genaueren Radio-Dünnschicht-Chromatographischen Testes konnten die mit dem biologischen Test erhaltenen Ergebnisse der Ammoniumsulfatfällung weitgehend bestätigt und abgesichert werden, wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist. Außerdem war es durch dieses Testsystem möglich, die Proteinfraction weiter einzuengen.

Reinigungsversuch mit Sephadex G 75.

Im Bestreben, eine weitere Abtrennung inaktiver Proteine aus dem durch die Ammoniumsulfatfällung angereicherten Enzymkomplex zu erhalten, wurde eine Sephadex G 75-Säule mit 3 ml der aktiven Proteinfraction beschickt. Zum Eluieren wurden 60 ml 0,1 m Phosphatpuffer benutzt und das Eluat in Fraktionen zu 3 ml aufgefangen. Das Ergebnis eines solchen Trennversuches ist in Tab. 7 zusammengefaßt. In den ersten 5 Fraktionen wurde kein Protein eluiert. In den nächsten 6 Fraktionen befand sich dann die gesamte Menge an Proteinen mit

Ammoniumsulfat- Fällung % Sättigung	% Inakti- vierung	Ecdyson cps	% der Gesamt Cps	Abbau- produkt A	% der Gesamt- cps	Abbau- Produkt B	% der Gesamt cps	Abbau- Produkt C	% der Gesamt cps
Ecdysonkontrolle	0 %	5500	100 %	-	-	-	-	-	-
0 - 30 %	8 %	5060	92 %	440	8 %	-	-	-	-
30 - 60 %	53 %	2600	47 %	1760	32 %	750	14 %	390	7 %
60 - 100 %	15 %	4680	85 %	550	10 %	160	3 %	110	2 %
0 - 45 %	9 %	5010	91 %	410		80		-	-
45 - 62,5 %	56 %	2400	44 %	1650	30 %	850	15 %	600	11 %
62,5 - 75 %	13 %	4800	87 %	380	7 %	170	3,2 %	150	2,8 %
75 - 100 %	7 %	5100	93 %	400	8 %	-	-	-	-
0 - 50 %	29 %	3850	71 %	1050	19 %	330	6 %	220	4 %
50 - 62,5 %	48 %	2850	52 %	1830	34 %	440	8 %	280	6 %

Tabelle 6: Reinigung des Ecdyson inaktivierenden Enzymsystems durch Ammoniumsulfatsättigung.

Die Enzymaktivität wurde im Radiodünnschichtchromatographischen Test gemessen.

Fractionen: Präzipitat der angegebenen Ammoniumsulfatsättigung.

Konzentration des Ecdysons und der Abbauprodukte in cps (links absolut, rechts Werte in % der Gesamtaktivität).

Fraktion	ml/Fraktion	Proteinmenge	%
		mg/ml	Inaktivierung
1	6	0	-
2	3	0	-
3	3	0	-
4	3	0	-
5	3	0,2	-
6	3	14	23 %
7	3	20	35 %
8	3	11	21 %
9	3	6	15 %
10	3	0,8	7 %
11	3	0,5	4 %
12	3	0	-
13	3	0	-
14	10	0	-

Tabelle 7: Trennung über Sephadex G 75. Die aufgetragene Proteinlösung betrug 3 ml und hatte eine Proteinmenge von 18 mg/ml Lösung. Eine Incubation der ursprünglichen Proteinfraktion ergab eine Inaktivierung von 53 %.

einem Maximum in Fraktion 7 und 8. Bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Proteinmengen in den Fraktionen 6 - 11 war kein nennenswerter Unterschied hinsichtlich der Ecdyson abbauenden Aktivität zu verzeichnen. Eine weitere Reinigung der aktiven Proteinfractionen war also auf diese Weise bisher nicht möglich.

Charakterisierung des Enzymsystems.

Temperatur-Optimum.

Die Inaktivierungsgeschwindigkeit des Ecdysons zeigt wie für enzymatische Reaktionen bekannt, eine starke Abhängigkeit von der Temperatur. Bis 38°C steigt die Abbaurrate für Ecdyson an. Bei Temperaturen über 40°C sinkt die Aktivität des Enzymsystems ab.

Art des Puffers und pH-Optimum.

Bei Verwendung verschiedener Puffer zeigte es sich, daß die höchsten Abbauraten von Ecdyson und die am besten reproduzierbaren Ergebnisse in einem Gemisch von KH_2PO_4 und Na_2PO_4 (0,2 m) erhalten werden. Tris- (Trihydroxymethylaminomethan) und Tris-Puffer (Triäthanolamin-Hydrat) erwiesen sich als weniger geeignet.

Die Prüfung der pH-Abhängigkeit des Ecdyson-inaktivierenden Enzymsystems ergab ein breites Optimum bei pH 7. Für Calliphora-Homogenat ist die Abhängigkeit der Ecdyson-Inaktivierungsrate in % bei verschiedenen pH-Werten in Abb. 8 aufgetragen. Für die gereinigte Enzymlösung wurde das gleiche pH-Optimum gefunden.

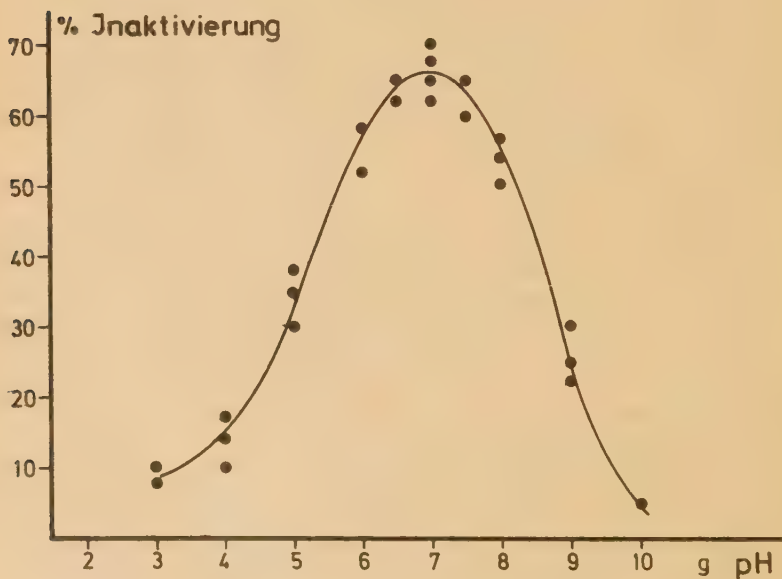


Abb. 8: pH-Abhängigkeit der Ecdyson-Inaktivierung durch Calliphora-Homogenat. (Erklärung siehe Text.)

Einfluß von Coenzymen.

Da Abbau und Inaktivierung zahlreicher Stoffe in den Insekten durch Glycosidbildung erfolgt (ISCHIGURA und LINZER, 1966) wurde der Einfluß von Uridin-Diphosphat-Glucose auf die Ecdyson Inaktivierung im Calliphora-Homogenat geprüft. Es ließ sich jedoch keine Änderung des inaktivierenden Systems durch Zusatz dieses Coenzym nachweisen.

Das Verschwinden der UV-Absorption des Ecdysons bei 241 m μ legt eine Reduktion nahe, wie sie auch bei anderen Steroidhormonen bekannt ist. Es wurde daher versucht, durch Zusatz von NADH oder NADPH diese Reaktion zu beschleunigen. [Außerdem ist NADPH Cofaktor bei einer Hydroxylierung.]

Durch Zusatz dieser Coenzyme konnte jedoch keine Erhöhung der Enzymaktivität beobachtet werden.

Zusatz	Konzentration	% Inaktivierung des Ecdysons
0	-	54 %
UDPG	$1 \cdot 10^{-3}$ m	56 %
NADH	$2 \cdot 10^{-3}$ m	52 %
NADPH	$2 \cdot 10^{-3}$ m	57 %

Tabelle 8: Prüfung des Einflusses verschiedener Coenzyme auf die Ecdysoninaktivierung im Calliphora-Homogenat. (Erklärung s. Text.)

Einfluß von Metall Ionen.

Da die Aktivität zahlreicher Enzyme durch Metall-Ionen beeinflusst wird, wurde der Effekt verschiedener Metallsalze auf das inaktivierende Enzymsystem geprüft. Folgende Salze zeigen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-3}$ m keine Aktivitätserhöhung des untersuchten Enzymsystems: Cu⁺⁺, Hg⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺, Fe⁺⁺.

Dialyse der Proteinfraction.

Ob überhaupt dialysable Faktoren an der Aktivität des Enzymsystems beteiligt sind wurde weiter durch Dialyse des Calli-

phora-Homogenats untersucht. Durch Dialyse bis 30 Stunden trat kein Aktivitätsverlust des Ecdyson abbauenden Enzymsystems ein. Die eingedampfte Dialyseflüssigkeit bewirkte auch keine Stimulierung der dialysierten Proteinfraction.

Wirkung enzymatischer Gifte.

Zur Prüfung, ob die Aktivität des Enzymsystems abhängig ist von Kaliumcyanid empfindlichen Oxydierungsreaktionen wurden Versuche mit $1 \cdot 10^{-2}$ m KCN angesetzt. Ein außerhalb der Schwankungsbreite liegender Hemmeffekt wurde hierdurch nicht bewirkt.

Abhängigkeit der Inaktivierung von der Incubationsdauer. Die Abhängigkeit der Ecdysoninaktivierung von der Zeit ist in Abbildung 9 graphisch dargestellt. Die halblogarithmische Auftragung der Ergebnisse ergibt eine Gerade. Bis zu sieben Stunden ist somit kein Verlust an Enzymaktivität zu beobachten.

Bestimmung der Michaeliskonstante.

Um ein Maß für die Affinität zwischen Enzym und Substrat zu bekommen, wurde die Konstante nach Michaelis und Menten bestimmt, indem die Inaktivierungsgeschwindigkeit für verschiedene Substratkonzentrationen gemessen wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 nach LINNEWEAVER und BURK (1934) als $1/v$ gegen $1/S$ aufgetragen. Aus der graphischen Darstellung ergibt sich für das Enzymsystem eine Michaeliskonstante von $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l und für die maximale Geschwindigkeit 0,4 μ m/min.

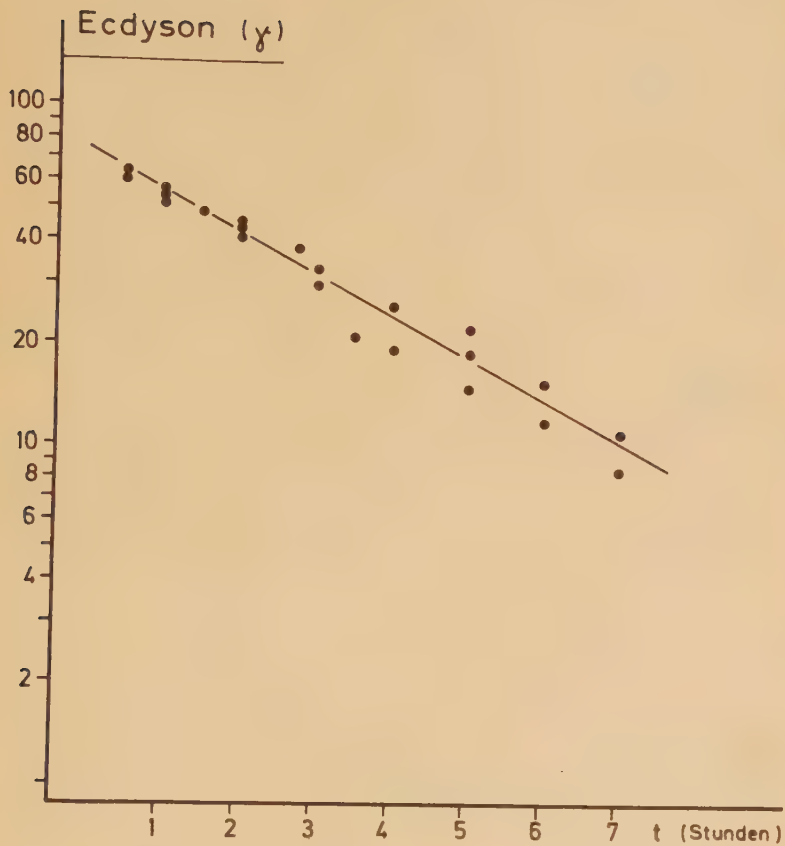
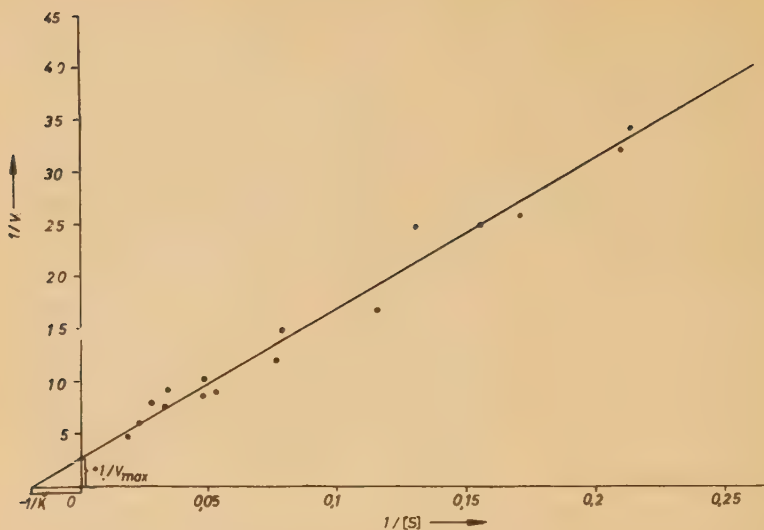


Abb. 9: Abhängigkeit der Ecdysoninaktivierung von der Incubationszeit. Halblogarithmischer Maßstab. Incubationsbedingungen siehe experimenteller Teil.



Bestimmung der Michaelis-Konstante nach Lineweaver und Burk, für die enzymatische Inaktivierung des Ecdysons. ($[S] : \mu\text{m}$; $v : \mu\text{m l/min}$)

Abbildung 10

Diskussion.

Für die biochemische Untersuchung eines Enzyms oder Enzymsystems ist stets ein guter biochemischer Test von Nöten, um die Aktivität des Enzyms rasch und einfach zu bestimmen. Am elegantesten gelingt dieses mit physikalisch-chemischen Methoden, zum Beispiel mit dem optischen Test nach WARBURG (1936) und BÜCHER (1964).

Zu Beginn der vorliegenden Untersuchungen war es außerordentlich hinderlich, daß die Inaktivierung des Ecdysons nur mit dem Biologischen Test erfaßt werden konnte. Sowohl in die Extraktionsmethode des Ecdysons, als auch vor allem in den biologischen Test selbst gingen so viele Parameter ein, daß die Genauigkeit der Ecdysonbestimmung und damit auch die

Genauigkeit der Enzymbestimmung höchst unbefriedigend war.

Im Prinzip sollte eine Verfolgung der Enzymwirkung durch laufende Messung des UV-Spektrums möglich sein, da während der enzymatischen Inaktivierung die Extinktion bei 241 μ abnimmt. (Vergleiche hierzu Abschnitt 5 sowie Tabelle 4). Es gelang jedoch nicht mit dieser Methode die Wirkung des Enzyms direkt zu erfassen; um brauchbare Messergebnisse zu erzielen, mußte das Protein abgetrennt und das Ecdyson extrahiert werden. Dadurch wurde dieser biochemische Test nicht nur unhandlich, sondern auch wesentlich ungenauer.

Eine befriedigend rasche und präzise Methode wurde schließlich im Radiochemischen Test gefunden; Radio-Dünnschicht-Chromatographisch konnten Ecdy^{-son}-mengen bis zu 5 μ g gut reproduzierbar quantitativ erfaßt werden. Ein weiterer wesentlicher Vorteil dieser Methode für unsere Fragestellung war die Möglichkeit, die entstehenden Inaktivierungsprodukte abzutrennen und vorläufig zu charakterisieren.

Parallel zu diesen Arbeiten zur Weiterentwicklung des Biochemischen Tests wurden Versuche zur Reinigung des Enzyms durchgeführt. Da es sich, wie oben im biologischen Teil gezeigt, um ein Enzym des Cytosols handelte, konnten die klassischen Methoden zur Proteinfractionierung direkt angewendet werden. Bei der Ammoniumsulfatfällung wurde eine erhebliche Anreicherung des Enzyms in der Fraktion zwischen 45 % und 62,5 % Sättigung erzielt. Insgesamt wurde damit eine sechsfache Anreicherung erreicht. Vorversuche zur chromatographischen Reinigung ergaben noch keine günstigen Resultate.

Das Enzym bzw. Enzymsystem konnte vorläufig durch einige Parameter charakterisiert werden. Das p H - O p t i m u m für das gereinigte Enzymsystem aus Calliphora liegt bei pH 7. Dieser Befund entsprach unseren Vermutungen, da dieser pH-Wert dem natürlichen Milieu entspricht (die Hämolymphe von Calliphora-Larven zeigt einen neutralen pH-Wert). als o p t i m a l e T e m p e r a t u r ergab sich der Bereich um 38°C. Von Bedeutung ist auch der Befund, daß das Enzym

durch D i a l y s e seine Wirksamkeit nicht einbüßt; daraus kann man schließen, daß weder lösliche Enzyme etwa vom Typ des NAD, noch irgendwelche besonderen Metall-Ionen oder Anionen für die Aktivität des Enzyms benötigt werden. Allerdings kann man nicht ganz ausschließen, daß Cofaktoren verhältnismäßig fest gebunden sind und unter unseren Versuchsbedingungen nicht abdissoziieren.

Die M i c h a e l i s K o n s t a n t e wurde durch Variation der Substratkonzentration bestimmt. Sie ergab sich zu $5 \cdot 10^{-5}$ M/l. Die Michaeliskonstante stellt zugleich die Dissoziationskonstante des Enzym-Substratkomplexes dar, sie ist also ein Maß für die Affinität von Enzym zu Substrat. Die niedrige Michaeliskonstante des untersuchten Systems deutet also auf eine hohe Affinität von dem inaktivierenden Enzymsystem zum Ecdyson. Es war interessant festzustellen, daß die natürliche Hormonkonzentration zur Zeit des höchsten Ecdysontiters, bei Vorpuppen von Calliphora, mit $0,08 \mu\text{g/g}$ Tier ($1,72 \cdot 10^{-7}$ M/l) noch um einen Faktor von $3 \cdot 10^{-2}$ unter der im Experiment gemessenen Michaeliskonstante liegt.

Über die chemische Reaktion, die der enzymatischen Inaktivierung von Ecdyson zugrunde liegt, d.h. über die Veränderung des Ecdysonmoleküls, läßt sich noch nichts entscheidendes aussagen. Nach den oben dargestellten Befunden über die UV-Absorption wird das chromatophore System des Ecdysons dabei aufgehoben; das würde am ehesten darauf schließen lassen, daß eine Reduktion entweder der Doppelbindung oder der Keto-Gruppe erfolgt. Die Versuche mit radioaktivmarkiertem Ecdyson haben gezeigt, daß zwei verschiedene Reaktionsprodukte entstehen. - Ein weiteres Produkt, das polarer ist als das Ecdyson selbst, ist möglicherweise ein Produkt bakterieller Zersetzung, da es in unterschiedlicher Konzentration auftritt und bei einem Zusatz von Antibiotika nicht auftritt. Diese Annahme wird außerdem durch einen Versuch gestützt, bei dem das Homogenat durch Kulturversuche auf Bakterienverunreinigung geprüft wurde. Es waren in diesem Fall keine Bakterien nachzuweisen. Im Chromatogramm dieses Extraktes fehlte aber auch das polare Produkt.

Die beiden Hauptprodukte A und B gehen wahrscheinlich auseinander hervor, das heißt wir nehmen an, daß das Ecdyson zunächst in eines dieser Produkte umgewandelt wird, und daß durch eine Folgereaktion das Zweite entsteht. Gesichert ist allerdings auch dieses noch nicht. Es sollte möglich sein, durch weitere Fraktionierung der Enzymproteine zu Präparaten zu gelangen, die nur die erste der beiden Reaktionen durchführen.

Leider stehen die vermuteten Produkte der Ecdysonumwandlung nicht als Vergleichssubstanzen zur Verfügung, so daß eine direkte Identifizierung noch nicht möglich war.

IV. Zusammenfassung

1. Die Injektion von Ecdyson in vivo ergab
 - a) für ungeschnürte Larven eine rasche Inaktivierung, es wurden in 90 Minuten 80 % des Ecdysons abgebaut.
 - b) für geschnürte Larven dagegen eine wesentlich langsamere Abbau, erst in 50 Stunden wurden 50 % des Ecdysons inaktiviert.
2. Die Prüfung verschiedener Organe ergab, daß die Inaktivierungsaktivität vorwiegend im Fettkörper lokalisiert ist.
3. Die intrazelluläre Lokalisation des Ecdyson inaktivierenden Enzymsystems wurde durch Ultrazentrifugation untersucht. Hierbei fand sich beinahe die gesamte Enzymaktivität im Überstand der Mikrosomenfraktion.
4. Die Messung der Inaktivierungshöhe im Verlauf der Entwicklung von *Calliphora* zeigt, daß die Enzymaktivität reziprok zum jeweiligen Ecdysontiter liegt.
5. Das inaktivierende Enzymsystem wurde durch Zentrifugation des Homogenats und anschließende fraktionierte Sättigung mit Ammoniumsulfat gereinigt und etwa um einen Faktor sechsfach angereichert. Hierbei fand sich die Hauptenzymaktivität in einer Fraktion zwischen 45 und 62,5 % Sättigung mit Ammoniumsulfat.
6. Durch Messung des Ultra-Violett-Spektrums der nach der Incubation extrahierten Lösungen konnte eine Abnahme des Absorptionsmaximums des Ecdysons bei 241 m μ verzeichnet werden.
7. Bei Versuchen mit Tritium markiertem Ecdyson ließen sich drei Inaktivierungsprodukte dünnschichtchromatographisch nachweisen. Von den Inaktivierungsprodukten verhalten sich eines polarer und zwei weniger polar als das Ecdyson.

Im Biologischen Test zeigen die Inaktivierungsprodukte bis zu 5 % der Ecdysonaktivität. Die Radiodünnschichtchromatographie erwies sich als zuverlässigste Methode zur Bestimmung von Ecdysonkonzentrationen und damit auch der Ecdysoninaktivierung.

8. Das Enzymsystem zeigte folgende Eigenschaften:

Das Temperaturoptimum für die Incubation liegt bei 38°C. Die Prüfung der pH-Abhängigkeit des inaktivierenden Enzymsystems in 0,2 m Phosphatpuffer, ergab ein pH-Optimum im neutralen Bereich.

Auch ein Zusatz von 2-wertigen Metall-Ionen ergab keine Aktivitätserhöhung.

Dialysable Cofaktoren ließen sich nicht nachweisen. Das Enzymsystem ist stabil.

Incubationen zeigten bei 38°C bis zu sieben Stunden keinen Verlust der Enzymaktivität.

Gegen Kaliumcyanid ist das Enzymsystem nicht sehr empfindlich.

Die Messung der Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit zur Substratkonzentration ergab für das gereinigte Enzymsystem eine Michaeliskonstante von $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l und eine maximale Geschwindigkeit von 0,4 μ m/min.

V. LITERATURVERZEICHNIS

- BECKER, E. und E. PLAGGE:
"Über das die Puparium-Bildung auslösende Hormon der Fliegen"
Biol. Zbl. 59, 326 - 341 (1939)
- BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK, K.h. GARBADE, E. MEYER-AHRENDT und G. PFLEIDERER:
"Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang"
Z. Naturf. 8b, 555 - 577 (1953)
- BODENSTEIN, D.:
"The Role of Hormones in Moulting and Metamorphosis"
In: ROEDERM Insect Physiology, New York, Wiley & Sons, 879 - 931 (1953)
- BÜCHER, Th., W. LUH und D. PETTE:
Hoppe-Seyler/Thierfelder, handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 6A, 292 - 339 (1964)
- BÜCKMANN, D.:
"Die Wirkung des Prothorakaldrüsenhormons als Farbwechselhormon bei Schmetterlingsraupen"
Verh. dtsh. zool. Ges., 220 - 225 (1957)
- BODE, Ch., H. GOEBELL, und E. STÄHLER:
"Zur Eliminierung von Trübungsfehlern bei der Eiweißbestimmung mit der Biuretmethode"
Z. klin. Chem., im Druck (1968)
- FRAENKEL, G.:
"Pupation of Flies initiated by a Hormone"
Nature, London, 133, 834 (1934)
- FRAENKEL, G.:
"A Hormone causing Pupation in the Blowfly Calliphora erythrocephala"
Proc. Roy. Soc. (B) 118, 1 - 12
- FUKUDA, S.:
"Induction of Pupation in Silkworm by Transplanting the Prothoracic Gland"
Proc. imp. Acad. Japan. 16, 417 - 420 (1940)
- FUKUDA, S.:
"The Hormonal Mechanism of Larval Molting and Metamorphosis in the Silkworm"
J. Fac. Sci. Tokyo Univ. 6 (4), 477 - 537 (1944)
- GERSCH, M.:
"Vergleichende Endokrinologie der wirbellosen Tiere"
Akad. Verlagsges., Geest & Portig (1964)

HOFFMEISTER, H.:

"Konstitutionsaufklärung des Ecdysons"
Diss. München 1963

HOFFMEISTER, H., C. RUFER und H. AMMON:

"Ausscheidung von Ecdyson bei Insekten"
Z. Naturf. 20b, 130 - 183 (1965)

HOFFMEISTER, H., C. RUFER, H. KELLER, H. SCHAIRER und
P. KARLSON:

Zur Chemie des Ecdysons III - "Vergleichende spektrometrische Untersuchungen an α , β -ungesättigten Steroidketonen"
Chem. Ber. 98, 2361 - 2375 (1965)

HÜBER, R. und W. HOPPE:

"Die Kristall- und Molekülstrukturanalyse des Insektenverpuppungshormons Ecdyson mit der automatisierten Faltmolekülmethode"
Chem. Ber. 98, 2403 - 2424 (1965)

ISCHIGURA, J. und B. LINZEN:

"Bildung von Glucosiden bei zwei Insektenarten *Locusta migratoria* und *Bombyx mori*"
J. Insect Physiol. 12, 267 - 273 (1966)

JOLY, P., M. BILL und M. HALBWACHS:

"Contrôle humoral du Développement chez *Locusta migratoria*"
Ann. Sci. nat. Zool. (11) 18, 256 - 261 (1956)

JACOB, F. und J. MONOD:

"Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins"
J. Mol. Biol. 3, 318 - 356 (1961)

KAISER, P.:

"Histologische Untersuchungen über die Corpora allata und Prothoraxdrüsen der Lepidopteren im bezug auf ihre Funktion"
Roux' Arch. Entw. Mech. Org. 144, 99 - 131 (1949)

KARLSON, P. und G. HANSER:

"Bildungsort und Erfolgsorgan des Puparisierungshormons der Fliegen"
Z. Naturf. 8b, 91 - 96 (1953)

KARLSON, P.:

"Biochemical Studies on Insect Hormones"
Vit. a. Horm. 14, 227 - 266 (1956)

KARLSON, P.:

"Über Häutungshormone der Arthropoden"
Zool. Anz., Suppl. 20, 203 - 208 (1957)

- KARLSON, P. und E. SHAAYA:
"Der Ecdysontiter während der Insektenentwicklung I -
Eine Methode zur Bestimmung des Ecdysongehalts"
J. Insect Physiol. 10, 797 - 804 (1964)
- KARLSON, P., H. HOFFMEISTER, H. HUMMEL, P. HOCKS und
G. SPITELLER:
"Zur Chemie des Ecdysons VI - Reaktionen des Ecdyson-
moleküls"
Chem. Ber. 98, 2394 - 2402 (1965)
- KARLSON, P.:
"Ecdyson, das Häutungshormon der Insekten"
Naturw. 18, 445 - 453 (1966)
- KARLSON, P., P. HOCKS und G. SCHULZ:
"Die Struktur des β -Ecdysons"
Naturwiss. 2, 44 - 45 (1967)
- KARLSON, P., C.E. SEKERIS und R. MAURER:
"Zum Wirkungsmechanismus der Hormone I - Verteilung
von Tritium-markiertem Ecdyson in Larven von Calliphora
erythrocephala"
Z. physiol. Chem. 336, 100 - 106 (1964)
- KARLSON, P.:
"Kurzes Lehrbuch der Biochemie"
Thieme-Verlag, Stuttgart, 6. Aufl. 1967
- KOPEC, S.:
"Studies on the Necessity of the Brain for the inception
of Insect Metamorphosis"
Biol. Bull., Wood's Hole 42, 323 - 342 (1922)
- KÜHN, A. und PIEPHO, H.:
"Über hormonale Wirkungen bei der Verpuppung der
Schmetterlinge"
Nachr. Ges. Wiss. Göttingen 2, 141 - 154 (1936)
- KÜHN, A. und PIEPHO, H.:
"Die Reaktionen der Hypodermis und Versonschen Drüsen
auf das Verpuppungshormon bei Ephestia kühniella"
Biol. Zbl. 58, 12 - 51 (1938)
- LINEWEAVER, H. und D. BURK:
"The Determination of Enzyme Dissociation Constants"
J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 (1934)
- MAURER, R.:
"Markierung von Steroiden und von Ecdyson mit Tritium
und Verteilung des markierten Insektenhormons in
Larven von Calliphora erythrocephala"
Diss. München 1964
- MICHAELIS, L. und K. MENTEN:
"Kinetik der Invertinwirkung"
Biochem. Z. 49, 333 - 369 (1913)

- MONOD, J. und D. POULSON:
"Specific Reactions of the Ovary to Interspecific Transplantations among Members of the *Melanogaster* Group of *Drosophila*"
Genetics 22, 257 - 263 (1937)
- NOVÁK, V.J.A.:
"Insect Hormones"
Methuen & Co. Ltd., London 1966
- O'FARRELL, A.F. und A. STOCK:
"Regeneration and the Moulting Cycle in *Blatella germanica* L. - I. Single Regeneration Initiated during the first Instar"
Austr. J. biol. Sci. 6, 485 - 500 (1953)
- PFLUGFELDER, O.:
"Entwicklungsphysiologie der Insekten"
Akad. Verlagsges., Geest & Portig, Leipzig, 2. Aufl. 1958
- ROBINSON, H.W. und HODGEN, C.H.:
"The biuret Reaction in the Determination of Serum Proteins"
J. Biol. Chem. 135, 727 - 731 (1940)
- SEKERIS, C.E., N. LANG und P. KARLSON:
"Zum Wirkungsmechanismus der Hormone V. - Der Einfluß von Ecdyson auf den RNA-Stoffwechsel in der Epidermis der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala*"
Z. physiol. Chem. 341, 36 (1965)
- Sephadex-Gelfiltration in Theorie und Praxis
Parmacia Fine Chemicals Uppsala Schweden (1967)
- SHAAYA, E. und P. KARLSON:
"Der Ecdysontiter während der Insektenentwicklung II - Die postembryonale Entwicklung der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala*."
J. Ins. Physiol. 2 65 - 69 (1965)
- SHAAYA, E. und C.E. SEKERIS:
"Ecdyson during Insects Development III - Activities of some Enzyms of Tyrosine Metabolism in Comparison with Ecdyson Titer during the Development of the Blowfly *Calliphora erythrocephala*."
Gen. comp. End. 5 35 - 39 (1965)
- STAHL, E.:
Dünnschicht-Chromatographie
Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York (1962)
- TATA, I.R.:
"Prepupal Molt in the Blowfly *Calliphora erythrocephala*"
Nat. 171 341 (1953)

WARBURG, O. und W. CHRISTIAN:
"Gärungs Co Ferment"
Bio. Z. 156 - 158 (1936)

WEBER, H.:
"Insektenkunde"
G. Fischer-Verlag Stuttgart (1954)

WIGGLESWORTH, V.G.:
"Physiologie of Insects Metamorphosis"
Cambridge University Press (1954)

WIGGLESWORTH, V.G.:
"The Physiology of ecdysis in Rhodnius II. - Factors
controlling Moulting and Metamorphosis"
Quart. J. Micr. Sci. 77 191 - 222 (1934)

WILLIAMS, R.H.:
Textbook of Endocrinologie
Saunders Company Philadelphia and London (1962)

Am 11. 9. 1942 wurde ich als Tochter des Chemikers Dr. Theodor Bücher und seiner Ehefrau Frida Martha, geb. Milde, in Berlin geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1949 bis 1953 in Elms-horn/Holstein. Ostern 1953 wurde ich in das dortige Gymnasium aufgenommen. Nach dem Wechsel nach Marburg bestand ich im Frühjahr 1962 die Reifeprüfung.

Im Sommersemester 1962 begann ich mit dem Studium der Naturwissenschaften an der Freien Universität Berlin und legte im November 1964 die Diplom-Vorprüfung (Haupt-fachrichtung Zoologie) ab. Das Studium setzte ich im Sommersemester 1965 an der Philipps-Universität Marburg/Lahn fort.

Im Frühjahr 1965 begann ich im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Marburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Karlson mit der vorliegenden Arbeit.

Seit Juli 1965 bin ich mit Herrn Dr. med. Christian Bode verheiratet.

Die vorliegende Arbeit entstand im Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität Marburg unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. P. Karlson in der Zeit von April 1965 bis Dezember 1967.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. P. Karlson, danke ich für seine vielfältigen Anregungen und die großzügige Unterstützung, die er mir während der Zeit in seinem Arbeitskreis zukommen ließ.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. F. Seidel für seine Förderung und sein stetes Interesse am Fortgang der Untersuchungen.

Meinem Mann, Herrn Dr. Ch. Bode, Frau Dr. H. Döpp, Herrn Dr. D. Adelung und Herrn Dr. D. Ellis danke ich für kritische Diskussion und zahlreiche nützliche Hinweise.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren Eckhardt, Günther, Jahr, Kümmel, Lassen, Lautsch, Luers, Manecke, Plieth, Reinert, Riemschneider, Thielke, Überreiter, Ulrich, Urich, Vetter (in Berlin) Cleffmann, Dimroth, Karlson, Klingenberg, Lüdke, Multsch, Seidel, Vogell (in Marburg).

Foto-Druck
Chemoprint^{OHG}
Gießen